

# 糸状菌の液体培養時の菌糸凝集メカニズムの解明とその物質生産への応用

著者	宮澤 拳
号	56
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1252号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00127961">http://hdl.handle.net/10097/00127961</a>

みやざわ けん

氏 名 ( ) 宮澤 拳 ( )

学 位 の 種 類 博士 (農学)

学 位 記 番 号 農博第 1252 号

学 位 授 与 年 月 日 令和 2 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 , 専 攻 東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 生物産業創成科学専攻

論 文 題 目 糸状菌の液体培養時の菌糸凝集メカニズムの解明とその物質生産への応用

博士論文審査委員 (主査) 教授 阿部 敬悦

准教授 新谷 尚弘

教授 高橋 英樹

教授 五味 勝也

論文内容要旨

糸状菌の液体培養時の菌糸凝集メカニズムの解明と  
その物質生産への応用

東北大学大学院農学研究科

生物産業創成科学専攻

宮澤 拳

指導教員

阿部 敬悦 教授

## 緒言

糸状菌は様々な有用物質の生産宿主として利用されている。糸状菌を用いた物質生産は大型の発酵タンクで液体培養されることが一般的である。糸状菌は細菌や酵母と比較して酵素や複雑な低分子化合物の生産に適している一方、糸状菌の菌糸は一般的に液体培養時に塊を形成しながら生育することから、塊の内部が嫌氣的となり、酸素や栄養成分の供給が不全となって、十分な生産効率が得られていないことが課題となっていた。糸状菌を用いた物質生産における技術革新は 1990 年代の多分岐変異株の開発以来滞っており、生産性改善に繋がる新技術が世界中の発酵生産メーカーから強く望まれている。これまで糸状菌がなぜ菌糸が塊を形成するかについてはほとんど明らかになっておらず、菌糸の塊形成の制御についても表現型からのアプローチ（攪拌回転数、pH、接種分生子数の制御等 [1]）に限られていた。

ところで、糸状菌は細胞壁と呼ばれる多糖を主成分とした構造体を持つ。細胞壁は生存に必須で、細胞形態の維持や細胞外情報の細胞内への伝達などの機能を持つ。その構造は細胞膜に近い内層に存在する  $\beta$ -1,3-グルカンやキチン、細胞壁外層に存在する  $\alpha$ -1,3-グルカン、細胞外マトリクスの成分の一つであるガラクトサミノガラクトタン (GAG) などから成る[2]。当研究室ではこれまで、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* における  $\alpha$ -1,3-グルカンの生物機能に着目して研究を進めてきた。従来、 $\alpha$ -1,3-グルカンは病原性糸状菌やヒト感染性酵母における病原因子としての機能が明らかになっていた一方[3; 4; 5]、非病原性の真菌においても  $\alpha$ -1,3-グルカンを有する種が多数存在することから、病原性以外の機能も有すると推定されるが、その機能は明らかになっていなかった。*A. nidulans* には 2 種の  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素 (AGS) 遺伝子 (*agsA*, *agsB*) が存在し、通常の生育条件では *agsB* が主に機能する[6; 7]。また、*agsB* 遺伝子破壊株においては  $\alpha$ -1,3-グルカンが細胞壁から欠損していた[6; 7]。さらに、 $\alpha$ -1,3-グルカン欠損株は菌糸が液体培地中に分散する形質を示すことが明らかになった[6]。このことから、 $\alpha$ -1,3-グルカンは菌糸塊形成因子として機能することが示唆された。また、興味深いことに、 $\alpha$ -1,3-グルカン欠損株は液体培養時に野生株に比べて菌体生育量が増加していた[8]。このことから、 $\alpha$ -1,3-グルカン欠損株の表現型が物質生産に応用できる可能性が示唆された。これまでのところ、 $\alpha$ -1,3-グルカンによる菌糸塊形成についての情報は不十分で、産業応用に向けては塊形成のメカニズムや  $\alpha$ -1,3-グルカン生合成機構などさらなる知見が必要である。本研究では、糸状菌の液体振盪培養における菌糸塊形成に着目し、① *A. nidulans* における細胞壁  $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量および細胞壁中の局在と菌糸凝集の関係性を明らかにすることを目的とした。また、産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* においては、 $\alpha$ -1,3-グルカン欠損株は菌糸完全分散には至ら

ず、小さな菌糸の塊を形成した。このことは本菌には  $\alpha$ -1,3-グルカン以外の因子が菌糸塊形成に寄与することを示唆している。そこで本研究では、②A. *oryzae* における第二の菌糸塊形成因子を探索することおよび菌糸塊形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 第1章 モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* における細胞壁 $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量および細胞壁中の局在と菌糸凝集の関係性の解析

上述の通り、*A. nidulans* の  $\alpha$ -1,3-グルカン生合成は通常の生育状態では主に *agsB* が機能することが明らかになっていた[6]。一方、*agsA* については分生子柄において発現が認められるという報告はあったものの[7]、その詳細な機能については不明であった。そこで、両合成酵素遺伝子の機能を比較解析するため、一方の AGS 遺伝子破壊株を親株として、もう一方の遺伝子を高発現した株を作製した (*agsA*<sup>OE</sup> 株、*agsB*<sup>OE</sup> 株)。これらの株と野生株を用いて液体振盪培養したところ、*agsB*<sup>OE</sup> 株は野生株と類似に緊密な菌糸塊を形成したのに対し、*agsA*<sup>OE</sup> 株では浮遊状の菌糸塊を形成した (Fig. 1-1)。そこで、この違いが両酵素が合成する  $\alpha$ -1,3-グルカンの化学構造の違いに起因するとの仮説を立て、各株の液体培養で得た菌糸から  $\alpha$ -1,3-グルカンを含む画分 (アルカリ可溶画分; AS 画分) を取得し、種々の多糖の化学構造解析を行った。<sup>13</sup>C NMR により、各株の AS 画分に含まれる多糖の主鎖は  $\alpha$ -1,3-グルカンであることが示された (Fig. 1-2)。糖鎖の結合様式解析手法であるメチル化分析により、*agsA*<sup>OE</sup> 株、*agsB*<sup>OE</sup> 株由来 AS 画分はいずれも約 90% は 1,3-結合が占め、数%程度の 1,2-, 1,6-結合 (マンナン由来と予想)、1,4-結合 ( $\alpha$ -1,3-グルカン鎖内のスペーサー構造由来と予想) も含まれていた (Table 1-1)。さらに、 $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量を測定するため、独自に高速ゲルろ過クロマトグラフィー-示差屈折検出系を確立し、分子量標準デキストランを用いて  $\alpha$ -1,3-グルカン分子量を推定した。その結果、*agsB*<sup>OE</sup> 株由来  $\alpha$ -1,3-グルカンのピーク分子量  $372 \pm 47$  kDa に対し、*agsA*<sup>OE</sup> 株では  $1,480 \pm 80$  kDa で顕著に増加していた (Table 1-2; Fig. 1-3a)。このことから、 $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量も菌糸の凝集性に影響することが示唆された。また、各株の AS 画分を糖鎖中の 1,2-, 1,4-, 1,6-結合を選択的に分解する Smith 分解処理し分子量を測定したところ、各株由来の AS 画分とも 35 kDa 前後 ( $\approx$  200 グルコース残基) にその分子量が低下した (Table 1-2; Fig. 1-3b)。このことから、本菌の  $\alpha$ -1,3-グルカン鎖中には、約 200 残基からなる  $\alpha$ -1,3-結合のグルコース残基が、数残基程度 (残基数は未決定) の  $\alpha$ -1,4-結合のグルコース残基に隔てられたサブユニット構造を有することが示唆された。さらに、 $\alpha$ -1,3-グルカン鎖中のサブユニット数は *agsA*<sup>OE</sup> 株で約 36 回、*agsB*<sup>OE</sup> 株で約 10 回であることが示唆された。

ところで、 $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量が変化することによって、細胞壁中における空間分布も変化する可能性が考えられた。そこで  $\alpha$ -1,3-グルカン、 $\beta$ -1,3-グルカンおよびキチンをそれぞれ  $\alpha$ -1,3-グルカン結合ドメイン融合 GFP (AGBD-GFP)、抗  $\beta$ -1,3-グルカン抗体—抗一次抗体 Alexa Fluor 594、小麦凝集素 Alexa Fluor 350 でそれぞれ蛍光標識し[5]、共焦点レーザー顕微鏡で各蛍光を観察した。その結果、野生株や *agsB*<sup>OE</sup> 株では  $\alpha$ -1,3-グルカン由来の蛍光が明瞭に観察されたのに対し、*agsA*<sup>OE</sup> 株では  $\alpha$ -1,3-グルカン由来の蛍光はわずかで、 $\beta$ -1,3-グルカンやキチン由来の蛍光が明瞭に観察された (Fig. 1-4)。このことから、 $\alpha$ -1,3-グルカンは *agsB*<sup>OE</sup> 株において細胞壁の外層に、*agsA*<sup>OE</sup> 株では内層に存在することが示唆された。更に、*agsA*<sup>OE</sup> 株の菌糸を  $\beta$ -1,3-グルカナーゼで処理し、上述のように蛍光染色したところ、*agsA*<sup>OE</sup> 株でも  $\alpha$ -1,3-グルカン由来の蛍光が明瞭に観察された (Fig. 1-5)。このことから、 $\alpha$ -1,3-グルカンは *agsB*<sup>OE</sup> 株では細胞壁外層に、*agsA*<sup>OE</sup> 株では細胞壁内層に主に局在していることが強く示唆された。以上をまとめると、菌糸の凝集性は  $\alpha$ -1,3-グルカンの量のみならず、その分子量と細胞壁中の局在によっても制御されることが明らかとなった。

## 第2章 産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* における第二の菌糸凝集因子の探索および菌糸凝集メカニズムの解析

*A. nidulans* における  $\alpha$ -1,3-グルカン欠損株の表現型を物質生産に応用することを見据え、*A. oryzae* においても  $\alpha$ -1,3-グルカン欠損 (AG $\Delta$ ) 株を作製し[9]、その表現型を解析した[8]。その結果、*A. oryzae* の AG $\Delta$  株の菌糸は、*A. nidulans* の  $\alpha$ -1,3-グルカン欠損株とは異なり、野生株に比べると小さな塊を形成し、均一分散には至らなかった[8]。このことは、*A. oryzae* には  $\alpha$ -1,3-グルカン以外の未知の菌糸凝集因子が存在することを示唆している。そこで本章では *A. oryzae* における第二の菌糸の凝集因子の同定と、 $\alpha$ -1,3-グルカンおよびその因子を介した菌糸凝集メカニズムを明らかにすることを目的とした。GAG は病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* においてバイオフィーム形成や負電荷表面への接着に関与する多糖である。その構造は、ガラクトピラノースと *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) がランダムに  $\alpha$ -1,4-結合で直鎖に連なり、GalNAc 残基の一部が脱アセチル化されてガラクトサミン (GalN) となっていることが分かっている[10; 11]。また、*A. fumigatus* において GAG は5遺伝子からなる遺伝子クラスター (*uge3*, *sph3*, *ega3*, *agd3*, *gtb3*) がコードするタンパク質により生合成されることが示唆されている[10]。*A. fumigatus* の GAG 欠損株においては、野生株で見られた菌糸表面の粘質状の修飾が欠損する[12; 13]。これらのことから、*A. oryzae* における第二の菌糸凝集因子が GAG であると仮説を立て、*A. oryzae* の野生株および AG $\Delta$  株を親株として、*A. oryzae* における *sphZ*, *ugeZ* 遺伝子 (そ



れぞれ *A. fumigatus* の *sph3*, *uge3* のオルソログ) を破壊した株を作製した (GAGΔ 株および AG-GAGΔ 株)。これらの株を液体振盪培養しその表現型を観察した結果、GAGΔ 株は野生株よりも大きな菌糸塊を形成した一方、AG-GAGΔ 株では菌糸が全く塊を形成しなかった (Fig. 2-1a; 本菌初の菌糸完全分散の達成)。すなわち、*A. oryzae* においては α-1,3-グルカンに加えて GAG も菌糸の凝集に寄与することが示唆された。続いて、菌糸の表面を走査型電子顕微鏡で観察したところ、野生株や AGΔ 株では菌糸表面に粘質状の凹凸が観察されたのに対し、GAGΔ 株および AG-GAGΔ 株ではその凹凸が消失していた (Fig. 2-1b)。このことから、GAG の生合成遺伝子破壊により、GAG の生合成が欠損したことが示唆された。

そこで、GAG を精製し、AG-GAGΔ 株の菌糸と混合することにより、GAG が直接的に菌糸の凝集に寄与するか否かを明らかにしようと試みた。具体的には 2% アスパラギン、5% グルコースを含む modified Brian medium [11] を用いて AGΔ 株を 30°C、72 時間培養し、培養上清を取得した。培養上清は透析後、終濃度 0.5 M となるよう NaOH を加えた。ここにエタノールを 0 から 2.5 倍量まで順に加え、4°C でインキュベートし、各段階における沈殿を回収し、単糖成分を分析した。その結果、1.5 倍量エタノール画分にはガラクトサミンが 15%、ガラクトースが 17% 含まれており (Fig. 2-2a)、GAG は主に 1.5 倍量エタノール画分に存在することが示唆された。次にこの 1.5 倍量画分を AG-GAGΔ 株の菌糸と 48 穴プレート中で混合し、1 時間振盪し、実体顕微鏡で観察したところ

(*in vitro* 凝集評価系)、菌糸の凝集が見られた (Fig. 2-2b)。さらに、この凝集体を蛍光標識された GalNAc 特異的レクチンで染色したところ、明瞭な蛍光が観察された (Fig. 2-2c)。このことから、GAG が直接的に菌糸の凝集に寄与することが強く示唆された。そこで、GAG を介した菌糸凝集メカニズムにさらに迫った。*In vitro* 凝集評価系において pH 4—7 の範囲において pH を変動させたところ、pH 6, 7 においては凝集体形成が見られた一方、pH 4, 5 においては凝集体が見られなかった (Fig. 2-3)。このことは GAG 分子中で脱アセチル化されて生じた GalN のアミノ基に低 pH 条件下でプロトンが付加し、静電反発が生じたことを示唆している。また、水素結合を切る尿素存在下で同様に凝集性を観察したところ、尿素濃度依存的に凝集体形成が見られなくなった (Fig. 2-4a)。さらに、GAG を介した凝集に GalN 残基のアミノ基を介した水素結合が関与するか否かを明らかにするため、GAG を無水酢酸存在下で *N*-アセチル化し、コロイド滴定法[14]により GAG 中の GalNAc 残基の脱アセチル化度を評価し、凝集性を観察した。その結果、アセチル化 GAG の脱アセチル化度は  $2.0 \pm 0.5\%$  で、非アセチル化 GAG ( $43.6 \pm 5.2\%$ ) に比べて顕著に減少した。また、アセチル化 GAG は菌糸を凝集させる性質を失っていた (Fig. 2-4b)。以上のことか

ら、GAG を介した菌糸凝集には GalN 残基のアミノ基を介した水素結合が重要であることが強く示唆された。AG-GAG 欠損株は、フラスコスケールの培養において組み換え酵素の生産性が野生株および AG 欠損株に比べて顕著に増加していたことから (Fig. 2-5)、本菌株は酵素生産に好適な宿主株であることが示唆された。

## 総括

本研究では *Aspergillus* 属糸状菌における菌糸接着因子に着目し、① *A. nidulans* における  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の機能解析および、② *A. oryzae* における  $\alpha$ -1,3-グルカン以外の第二の菌糸接着因子の探索とその因子を介した菌糸塊形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

- ① *A. nidulans* の野生株や *agsB*<sup>OE</sup> 株は液体振盪培養時に緊密な菌糸の塊を形成したのに対し、*agsA*<sup>OE</sup> 株は密度の低い菌糸塊を形成した。この表現型の違いは、両高発現株の間で  $\alpha$ -1,3-グルカンの化学構造鎖によってもたらされることが考えられた。種々の化学構造解析の結果、*agsA*<sup>OE</sup> 株の  $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量は *agsB*<sup>OE</sup> 株に比べて約 4 倍大きいことが明らかになった。また、野生株や *agsB*<sup>OE</sup> 株の  $\alpha$ -1,3-グルカンは細胞壁の外層に局在しているのに対し、*agsA*<sup>OE</sup> 株では細胞壁内層に局在していることが示唆された。以上のことから、菌糸の接着性は従来知られていた  $\alpha$ -1,3-グルカンの量だけでなく、 $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量とその細胞壁中における局在によっても制御されることが示唆された。*agsB* 遺伝子に隣接する二つの  $\alpha$ -amylase 遺伝子も  $\alpha$ -1,3-グルカン生合成に寄与することが明らかになりつつあり [7; 15]、 $\alpha$ -1,3-グルカン生合成全体を俯瞰した酵素学的解析や生化学的解析により、今後  $\alpha$ -1,3-グルカン生合成機構の全貌解明が期待される。
- ② *A. oryzae* においては  $\alpha$ -1,3-グルカンが欠損しても菌糸は完全分散には至らず、野生株に比べて小さな塊を形成しながら生育したことから、*A. oryzae* における  $\alpha$ -1,3-グルカン以外の菌糸塊形成因子の存在が示唆された。本研究では、病原性糸状菌 *A. fumigatus* における知見をヒントに、細胞外分泌多糖 GAG に着目した。*A. oryzae* の AG $\Delta$  株に対し GAG 生合成遺伝子を破壊した AG-GAG $\Delta$  株では、菌糸が全く塊を形成せず、培地中に菌糸が均一分散した。このことは、*A. oryzae* においては GAG も菌糸接着因子として機能することを示唆している。そこで、GAG を培養上清から精製する手法を確立し、GAG を AG-GAG $\Delta$  株の菌糸と混合した結果、菌糸が凝集した。このことから、GAG が直接的に菌糸塊形成に寄与することが強く示唆された。また、GAG の *N*-アセチル化や尿素存在下での凝集試験により、GAG 分子中の GalN 残基のアミノ基を介した水素結合が GAG を介した菌



糸塊形成の本質であることが示唆された。AG-GAGΔ 株はフラスコスケールで組換え酵素の生産性が向上していたほか、現在実験室スケールのジャー培養槽での培養試験においても AG-GAGΔ 株の優位性が明らかになりつつある。今後、AG-GAGΔ 株の培養特性の解析や、 $\alpha$ -1,3-グルカンや GAG の生合成機構解明および両多糖の制御法の確立により、糸状菌を用いた物質生産の飛躍的向上の可能性が期待される。

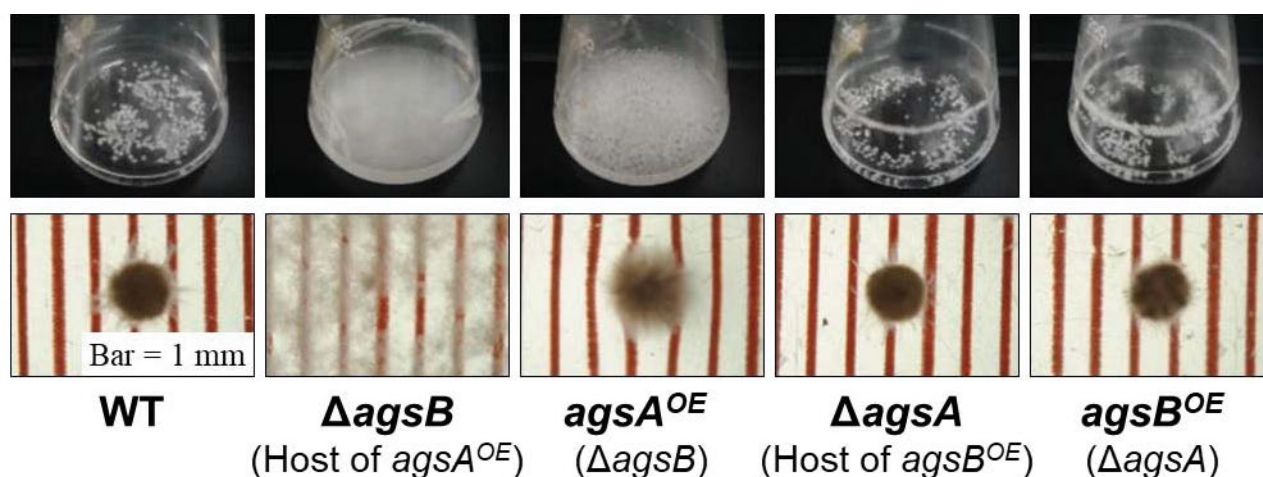
## 引用文献

- [1] R. Krull, T. Wucherpennig, M.E. Esfandabadi, R. Walisko, G. Melzer, D.C. Hempel, I. Kampen, A. Kwade, and C. Wittmann, Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol* 163 (2013) 112-23.
- [2] A. Yoshimi, K. Miyazawa, and K. Abe, Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. *Biosci Biotechnol Biochem* 80 (2016) 1700-11.
- [3] A.J. Reese, A. Yoneda, J.A. Breger, A. Beauvais, H. Liu, C.L. Griffith, I. Bose, M.J. Kim, C. Skau, S. Yang, J.A. Sefko, M. Osumi, J.P. Latge, E. Mylonakis, and T.L. Doering, Loss of cell wall  $\alpha(1-3)$  glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol Microbiol* 63 (2007) 1385-98.
- [4] C.A. Rappleye, J.T. Engle, and W.E. Goldman, RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for  $\alpha(1,3)$ -glucan in virulence. *Mol Microbiol* 53 (2004) 153-65.
- [5] T. Fujikawa, Y. Kuga, S. Yano, A. Yoshimi, T. Tachiki, K. Abe, and M. Nishimura, Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol Microbiol* 73 (2009) 553-70.
- [6] A. Yoshimi, M. Sano, A. Inaba, Y. Kokubun, T. Fujioka, O. Mizutani, D. Hagiwara, T. Fujikawa, M. Nishimura, S. Yano, S. Kasahara, K. Shimizu, M. Yamaguchi, K. Kawakami, and K. Abe, Functional analysis of the  $\alpha$ -1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: AgsB is the major  $\alpha$ -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS ONE* 8 (2013) e54893.
- [7] X.X. He, S.N. Li, and S.G.W. Kaminskyj, Characterization of *Aspergillus nidulans*  $\alpha$ -glucan synthesis: roles for two synthases and two amylases. *Mol. Microbiol.* 91 (2014) 579-595.
- [8] K. Miyazawa, A. Yoshimi, S. Zhang, M. Sano, M. Nakayama, K. Gomi, and K. Abe, Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan synthase. *Biosci Biotechnol Biochem* 80 (2016) 1853-63.
- [9] S. Zhang, H. Sato, S. Ichinose, M. Tanaka, K. Miyazawa, A. Yoshimi, K. Abe, T. Shintani, and K. Gomi, Cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan prevents alpha-amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng* 124 (2017) 47-53.
- [10] M.J. Lee, A.M. Geller, N.C. Bamford, H. Liu, F.N. Gravelat, B.D. Snarr, F. Le Mauff, J. Chabot, B. Ralph, H. Ostapska, M. Lehoux, R.P. Cerone, S.D. Baptista, E. Vinogradov, J.E. Stajich, S.G. Filler, P.L. Howell, and D.C. Sheppard, Deacetylation of fungal exopolysaccharide mediates adhesion and biofilm formation. *mBio* 7 (2016) e00252-16.
- [11] T. Fontaine, A. Delangle, C. Simenel, B. Coddeville, S.J. Van Vliet, Y. Van Kooyk, S. Bozza, S. Moretti, F. Schwarz, C. Trichot, M. Aebi, M. Delepierre, C. Elbim, L. Romani, and J.-P. Latgé, Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens* 7 (2011) e1002372.

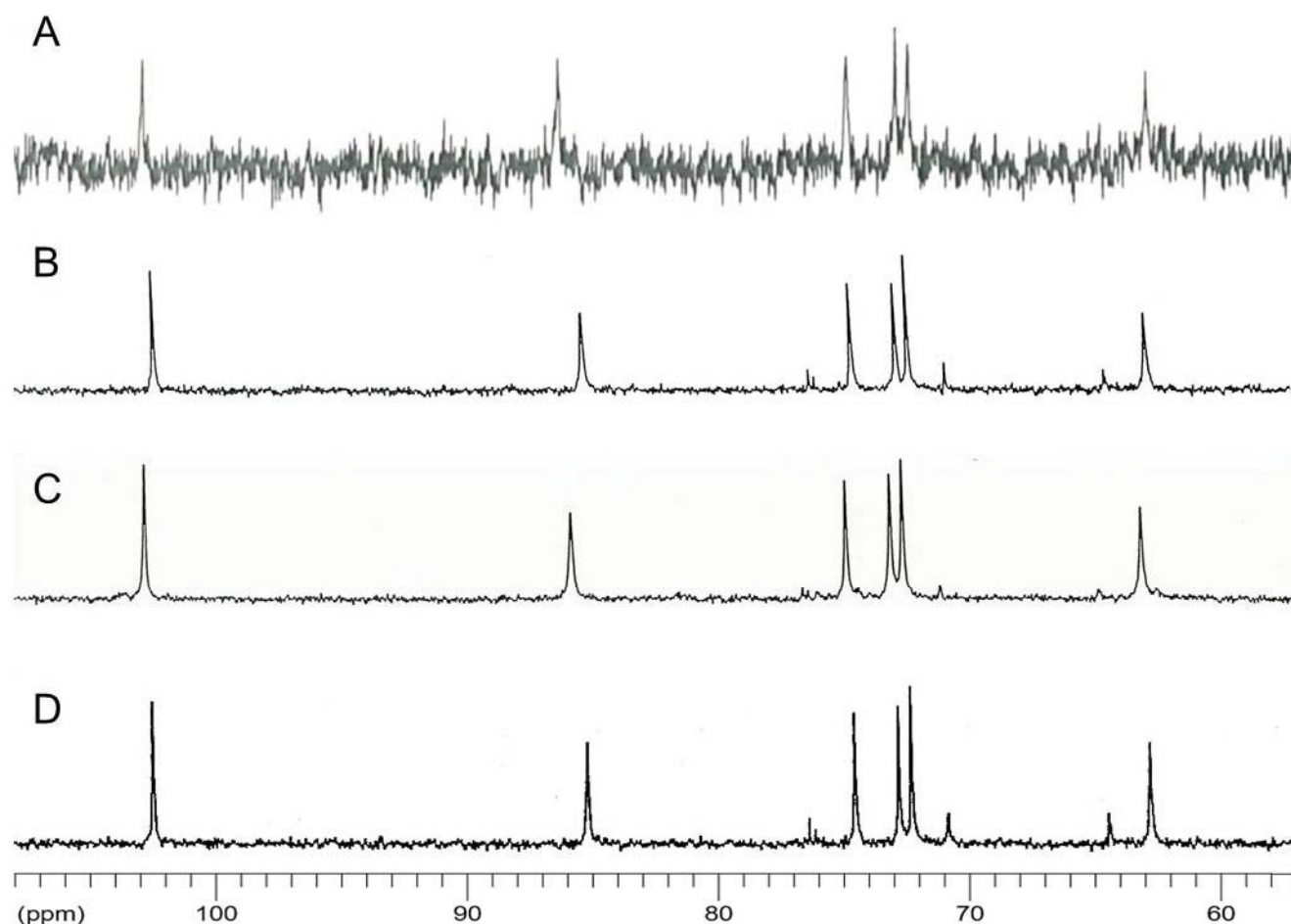
- [12] N.C. Bamford, B.D. Snarr, F.N. Gravelat, D.J. Little, M.J. Lee, C.A. Zacharias, J.C. Chabot, A.M. Geller, S.D. Baptista, P. Baker, H. Robinson, P.L. Howell, and D.C. Sheppard, Sph3 is a glycoside hydrolase required for the biosynthesis of galactosaminogalactan in *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 290 (2015) 27438-50.
- [13] F.N. Gravelat, A. Beauvais, H. Liu, M.J. Lee, B.D. Snarr, D. Chen, W. Xu, I. Kravtsov, C.M. Hoareau, G. Vanier, M. Urb, P. Campoli, Q. Al Abdallah, M. Lehoux, J.C. Chabot, M.C. Ouimet, S.D. Baptista, J.H. Fritz, W.C. Nierman, J.P. Latge, A.P. Mitchell, S.G. Filler, T. Fontaine, and D.C. Sheppard, *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal beta-glucan from the immune system. *PLoS Pathog* 9 (2013) e1003575.
- [14] T. Hattori, S. Munezane, R. Kato, and T. Kawauchi, Evaluation of colloidal titration with potassium poly(vinylsulfate) to determine the degree of chitosan deacetylation. *Chitin and Chitosan Research* 15 (2009) 13-19.
- [15] X. He, S. Li, and S. Kaminskyj, An Amylase-Like protein, AmyD, is the major negative regulator for  $\alpha$ -glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* during the asexual life cycle. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017) 695.

#### 原著論文

- [1] K. Miyazawa, A. Yoshimi, M. Sano, F. Tabata, A. Sugahara, S. Kasahara, A. Koizumi, S. Yano, T. Nakajima, and K. Abe, Both galactosaminogalactan and  $\alpha$ -1,3-glucan contribute to aggregation of *Aspergillus oryzae* hyphae in liquid culture. *Frontiers in Microbiology* 10 (2019) 2090.
- [2] K. Miyazawa, A. Yoshimi, S. Kasahara, A. Sugahara, A. Koizumi, S. Yano, S. Kimura, T. Iwata, M. Sano, and K. Abe, Molecular mass and localization of  $\alpha$ -1,3-glucan in cell wall control the degree of hyphal aggregation in liquid culture of *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in Microbiology* 9 (2018) 2623.
- [3] K. Miyazawa, A. Yoshimi, S. Zhang, M. Sano, M. Nakayama, K. Gomi, and K. Abe, Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan synthase. *Biosci Biotechnol Biochem* 80 (2016) 1853-63.



**Figure 1-1. Growth of the wild-type,  $\Delta$ agsB, agsA<sup>OE</sup>,  $\Delta$ agsA, agsB<sup>OE</sup> strains.** Upper row, photographs of cultures in Erlenmeyer flasks; lower row, representative hyphal pellets of each strain under a stereomicroscope. Scale intervals are 1 mm.



**Figure 1-2. <sup>13</sup>C-NMR spectra of the alkali-soluble (AS) fractions from the wild-type (WT), agsA<sup>OE</sup>, and agsB<sup>OE</sup> strains.** The AS fractions from (A) wild-type, (B) agsA<sup>OE</sup>, and (C) agsB<sup>OE</sup> strains were dissolved in 1 M NaOH/D<sub>2</sub>O. (D) Mutan enzymatically synthesized by the action of GTF-J from *Streptococcus salivarius* and representing a standard molecule of α-1,3-glucan. NMR spectra were measured at 400 MHz at 35° C. Chemical shifts were recorded relative to the resonance of DMSO-d<sub>6</sub>.

**Table 1-1. Methylation analysis of alkali-soluble glucan**

Alditol acetate	Linkage	RT (min)	Molar amount (%)		
			WT	<i>agsA</i> <sup>OE</sup>	<i>agsB</i> <sup>OE</sup>
2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-Glc	G <sub>1</sub> -	15.1	0.69	0.46	0.73
2,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-Glc	- <sub>3</sub> G <sub>1</sub> -	16.4	89.31	94.09	87.98
2,3,6-Tri- <i>O</i> -Me-Glc	- <sub>4</sub> G <sub>1</sub> -	16.5	5.41	1.74	7.01
3,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-Glc	- <sub>2</sub> G <sub>1</sub> -	17.4	2.08	1.45	1.68
2,4-Di- <i>O</i> -Me-Glc	- <sub>6</sub> <sub>3</sub> G <sub>1</sub> -	17.9	2.51	2.26	2.42

2,3,4,6-Tetra-*O*-Me-Glc: 1,5-di-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucitol 2,4,6-Tri-*O*-Me-Glc: 1,3,5-tri-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-D-glucitol

2,3,6-Tri-*O*-Me-Glc: 1,4,5-tri-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-D-glucitol

3,4,6-Tri-*O*-Me-Glc: 1,2,5-tri-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-D-glucitol

2,4-Di-*O*-Me-Glc: 1,3,5,6-tetra-acetyl-2,4-di-*O*-methyl-D-glucitol

RT: retention time

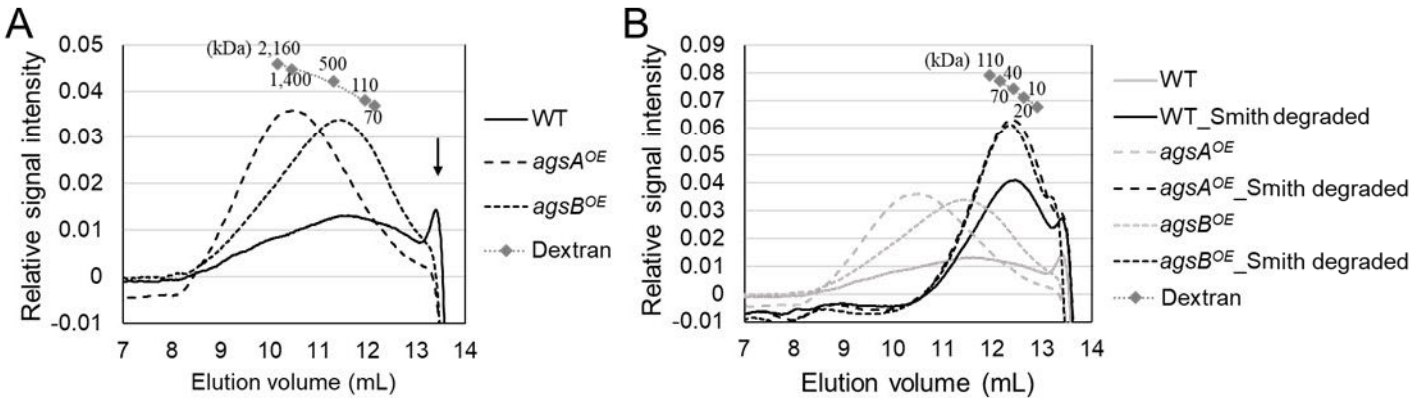
**Table 1-2. Molecular mass and degree of polymerization of alkali-soluble glucans from  $\alpha$ -1,3-glucan synthase-overexpressing strains**

Sample	M <sub>p</sub> <sup>a</sup> (kDa)	DP <sup>b</sup>
WT AS2 <sup>c</sup>	147 ± 52	908 ± 319
WT AS2, Smith-degraded	31.6 ± 3.7	195 ± 23
<i>agsA</i> <sup>OE</sup> AS2	1,480 ± 80	9,160 ± 520
<i>agsA</i> <sup>OE</sup> AS2, Smith-degraded	41.6 ± 5.8	257 ± 36
<i>agsB</i> <sup>OE</sup> AS2	372 ± 47	2,230 ± 290
<i>agsB</i> <sup>OE</sup> AS2, Smith-degraded	38.3 ± 3.0	237 ± 19

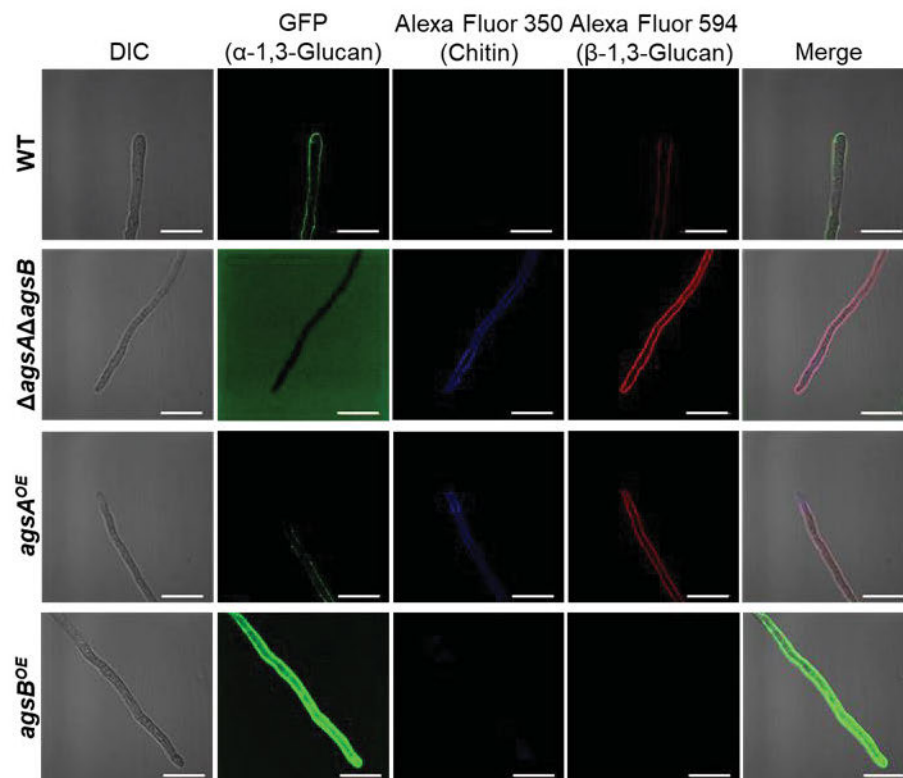
<sup>a</sup>Molecular mass of the peak.

<sup>b</sup>Degree of polymerization.

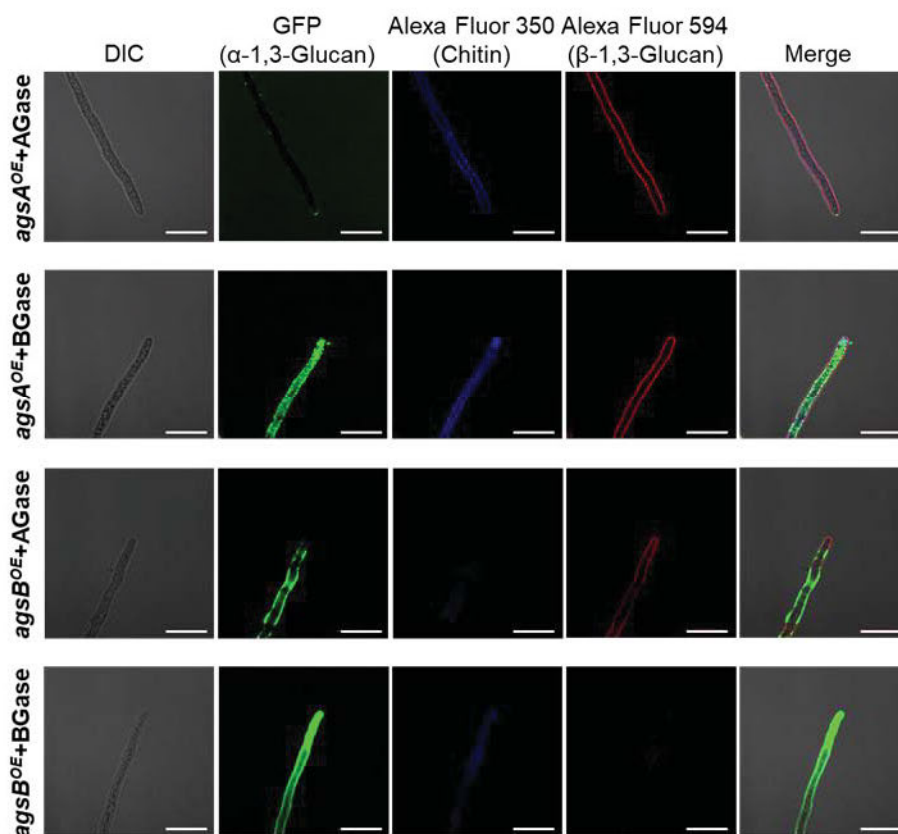
<sup>c</sup>AS2, insoluble components after dialysis of the alkali-soluble fraction. Values represent the mean ± standard deviation of three replicates.





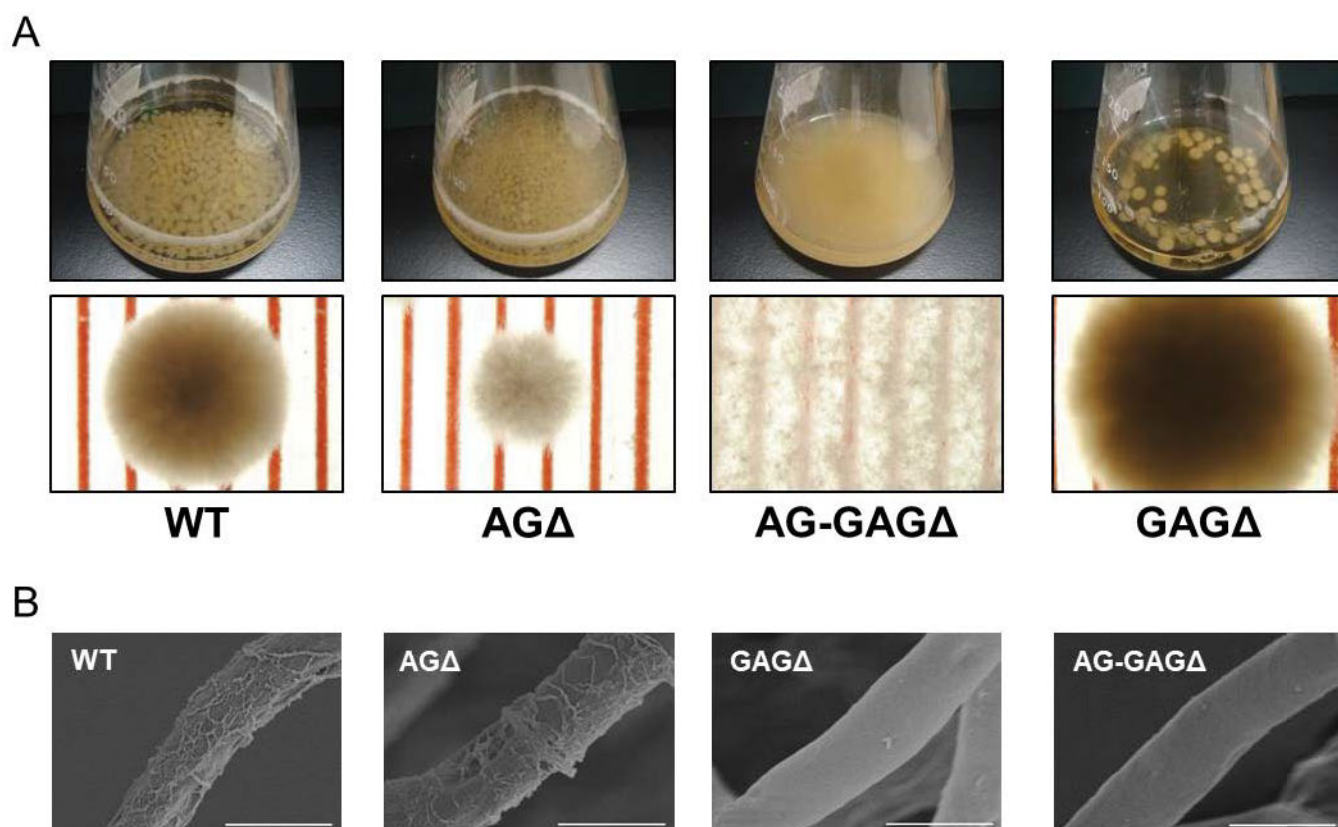


**Figure 1-4. Localization of cell wall polysaccharides of vegetative hyphae.** Hyphae cultured in CD (minimal) liquid medium for 12 h were fixed and stained with AGBD-GFP for  $\alpha$ -1,3-glucan, fluorophore-labeled antibody for  $\beta$ -1,3-glucan, and fluorophore-labeled lectin for chitin. Scale bars are 10  $\mu$ m.

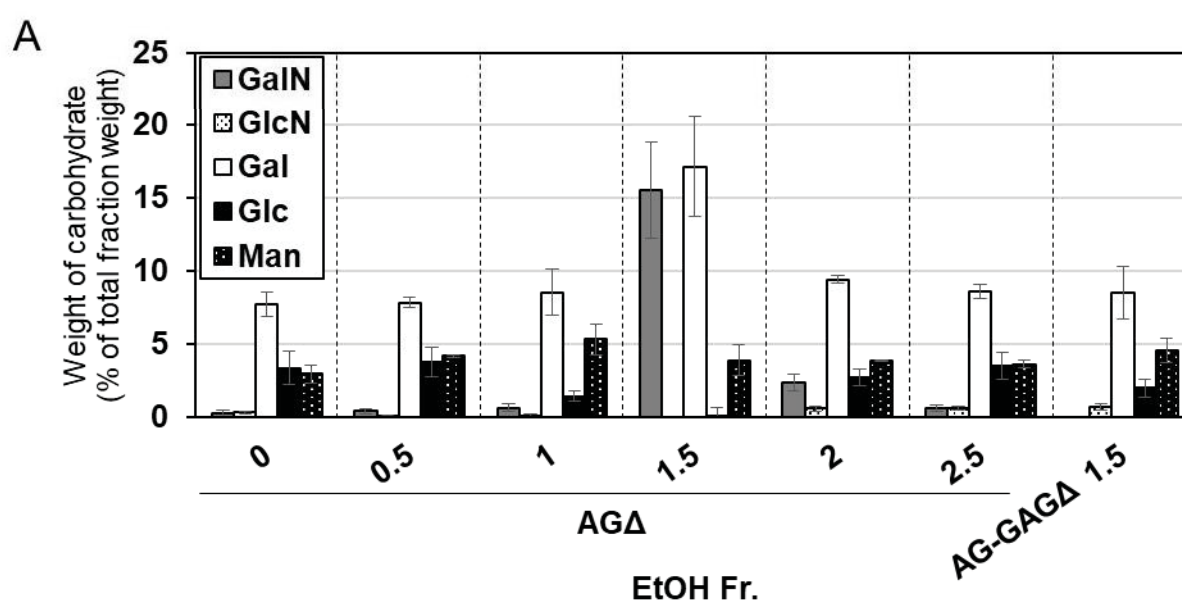


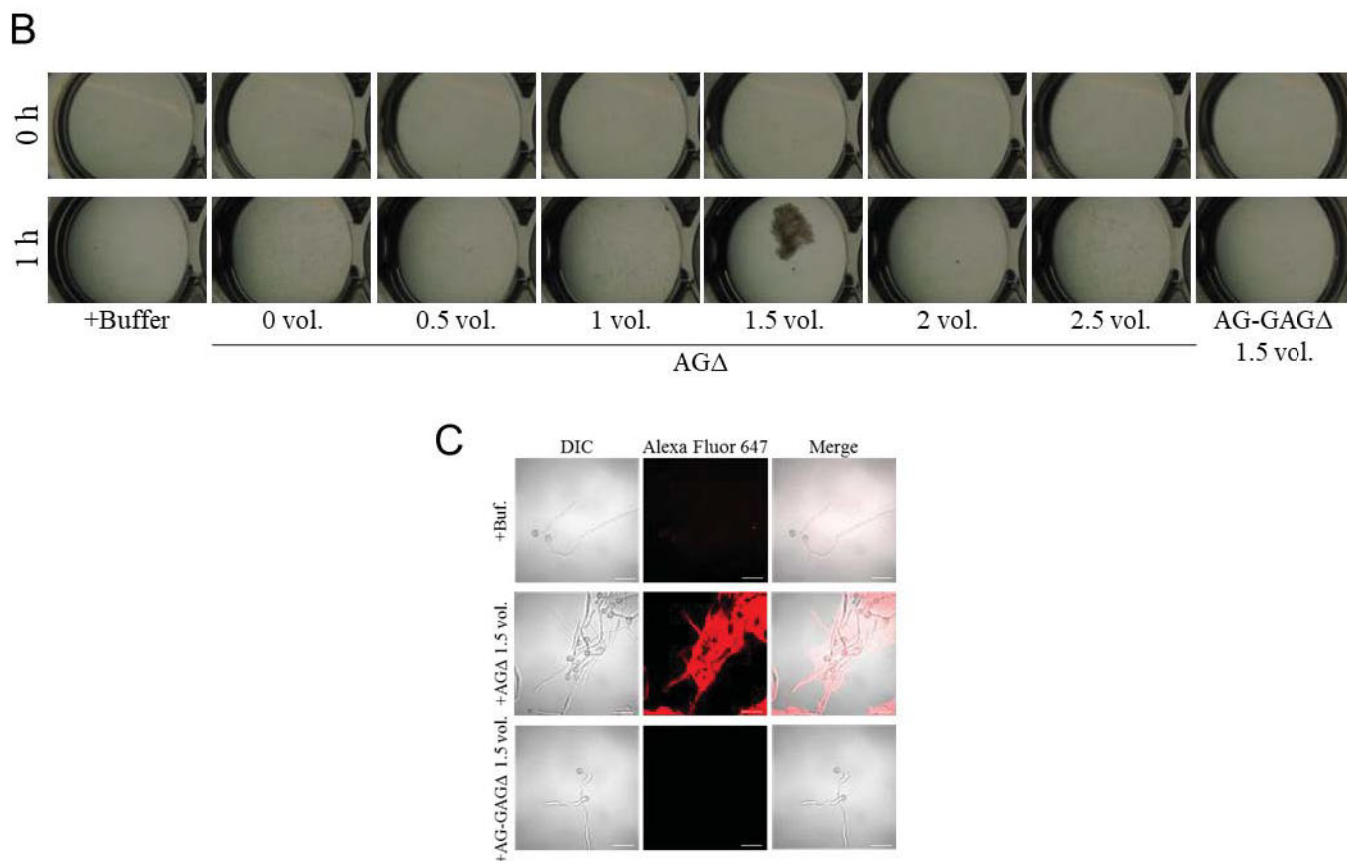
**Figure 1-5. Localization of cell wall polysaccharides after treatment with  $\alpha$ -1,3-glucanase or  $\beta$ -1,3-glucanase.** Vegetative hyphae cultured for 12 h were fixed and treated with  $\alpha$ -1,3-glucanase (AGase) or  $\beta$ -1,3-glucanase (BGase) for 6 h. The hyphae were stained with AGBD-GFP for  $\alpha$ -1,3-glucan, fluorophore-labeled antibody for  $\beta$ -1,3-glucan, and fluorophore-labeled lectin for chitin. Scale bars are 10  $\mu$ m.



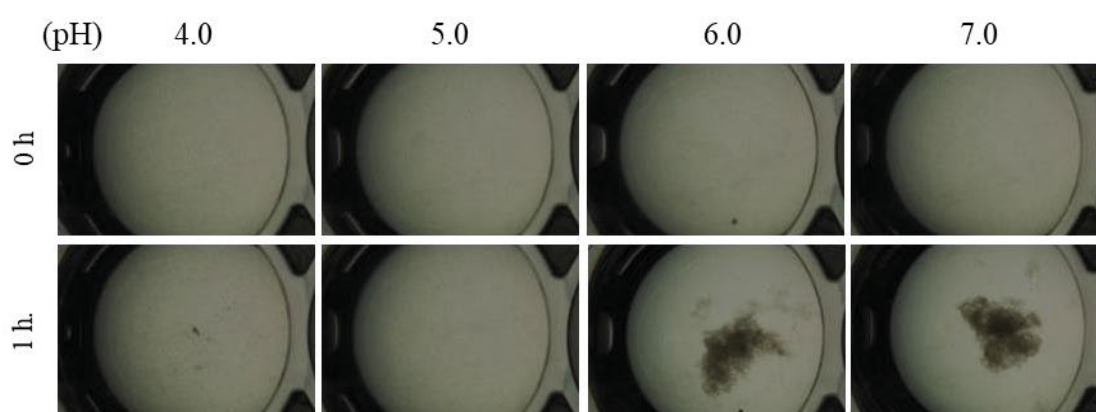


**Figure 2-1. Phenotypes of *Aspergillus oryzae*  $\Delta agsA\Delta agsB\Delta agsC\Delta sphZ\Delta ugeZ$  (AG-GAGΔ) and  $\Delta sphZ\Delta ugeZ$  (GAGΔ) strains in liquid culture. (A)** The wild-type (WT),  $\Delta agsA\Delta agsB\Delta agsC$  (AGΔ), AG-GAGΔ, and GAGΔ strains were cultured in Erlenmeyer flasks (upper row), and images of hyphal pellets were taken under a stereomicroscope (bottom row; scale, 1 mm) at 24 h of culture. **(B)** Morphology of each strain was examined under a scanning electron microscope. Scale bars, 5 μm.

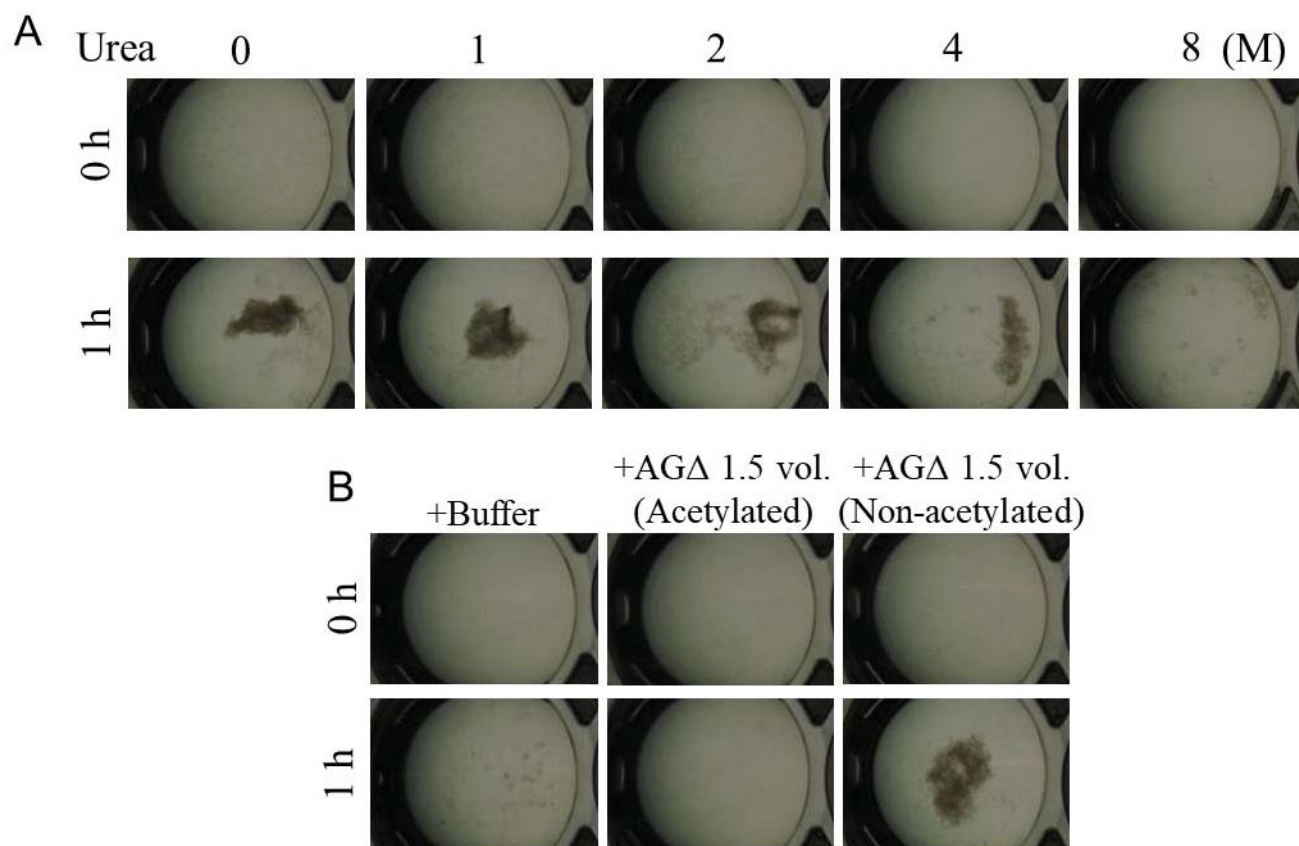




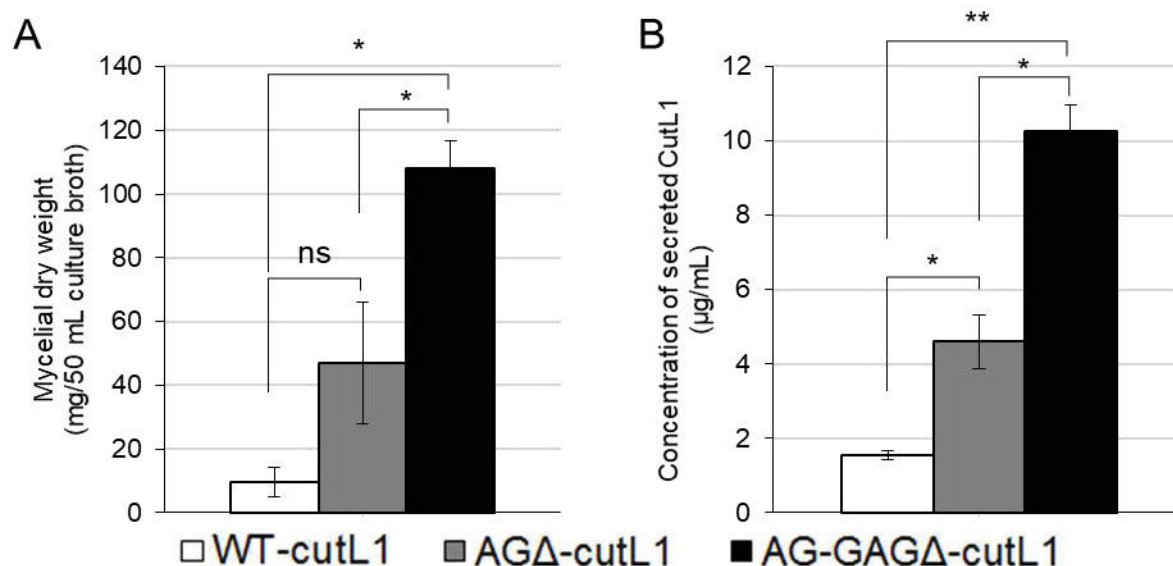
**Figure 2-2. Aggregation of mycelia of the AG-GAG $\Delta$  strain induced by ethanol-precipitated GAG.** (A) Composition of the fractions obtained by ethanol precipitation. (B) Mycelial suspension of the AG-GAG $\Delta$  strain (25  $\mu$ L) was added into a mixture of 400  $\mu$ L of water, 50  $\mu$ L of 1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0), and 25  $\mu$ L of 2 mg/mL of the fractions prepared from the AG $\Delta$  or AG-GAG $\Delta$  strains, as indicated. Samples were incubated at 30° C for 1 h with shaking and examined under a stereomicroscope (magnification,  $\times 8$ ). (C) Mycelia incubated for 1 h in the presence of EtOH-precipitated GAG were stained with soybean agglutinin–Alexa Fluor 647 conjugates and observed under a confocal laser-scanning microscope ( $\times 1000$ ). Scale bars, 20  $\mu$ m.



**Figure 2-3. pH-dependence of GAG aggregation.** Mycelial suspension of the AG-GAG $\Delta$  strain (25  $\mu$ L) was added to 450  $\mu$ L of buffers with different pH and 25  $\mu$ L of the 1.5 vol. EtOH fraction prepared from the AG $\Delta$  or AG-GAG $\Delta$  strain as indicated. Samples were incubated at 30°C 1 h with shaking and examined under a stereomicroscope (magnification,  $\times 8$ ).



**Figure 2-4.** Mycelial aggregation in the presence of (A) urea or (B) acetylated GAG. (A) Mycelial suspension of the AG-GAGΔ strain (25  $\mu$ L) was added to a mixture of 450  $\mu$ L of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0, 1, 2, 4, or 8 M urea, and 25  $\mu$ L of the 1.5 vol. EtOH fraction prepared from the AGΔ strain. (B) The amino groups of ethanol-precipitated GAG were acetylated with acetic anhydride. Mycelial suspension of the AG-GAGΔ strain (25  $\mu$ L) was added to a mixture of 450  $\mu$ L of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and 25  $\mu$ L of the 1.5 vol. EtOH fraction prepared from AGΔ (acetylated or not). Samples were incubated at 30° C for 1 h with shaking and examined under a stereomicroscope (magnification,  $\times 8$ ).



**Figure 2-5.** Recombinant CutL1 production by the WT-cutL1, AGΔ-cutL1, and AG-GAGΔ-cutL1 strains in liquid culture. (A) Mycelial dry weight of each strain. Mycelia grown for 24 h were collected by filtration through Miracloth, dried at 70°C and weighed. (B) Concentration of secreted CutL1 in culture supernatants. In (B) and (C), error bars represent the standard error of the mean calculated from three replicates (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). ns, not significant.



## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	宮澤 拳
審 査 委 員	主査：教授 阿部 敬悦 副査：准教授 新谷 尚弘 教授 高橋 英樹 教授 五味 勝也
学 位 論 文 題 目	糸状菌の液体培養時の菌糸凝集メカニズムの解明とその物質生産への応用
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>糸状菌は細菌や酵母と比較して複雑な低分子化合物やタンパク質の生産能に優れ、生産物の分泌能力が高いことから、様々な有用物質の生産宿主として微生物を用いた発酵生産において重要な位置を占める。糸状菌を用いた発酵生産は酸素や誘導基質の拡散が容易な液体培養で行われることが一般的である。糸状菌は一般的に絶対好気性の微生物であるが、糸状菌が液体振盪培養時に菌糸が塊を形成する性質のために、塊の内部が嫌氣的となり、十分な発酵生産効率に達していないことが課題となっていた。</p> <p>候補者は、糸状菌の菌糸凝集に着目し、以下の二項目について研究を進めた。</p> <p>(1) モデル糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> において、細胞壁多糖 <math>\alpha</math>-1,3-グルカン (AG) が欠損すると菌糸が液体培地中に均一分散することから、AG は菌糸凝集因子として機能することが分かっていた。候補者は本菌における二種の AG 合成酵素遺伝子の高発現株の間で菌糸凝集性が異なることを発見し、両株の AG の化学構造を詳細に解析し、その違いが AG の分子量の差に起因することを明らかにした。また、分子量の小さな AG が細胞壁外層に、分子量の大きな AG が細胞壁内層に局在することを示し、細胞壁外層の AG が菌糸接着に寄与するモデルを初めて提案した。</p> <p>(2) 産業用糸状菌 <i>Aspergillus oryzae</i> においては AG を欠損しても菌糸が分散するには至らなかったことから、本菌には未知の菌糸凝集因子の残存が示唆されていた。候補者は第二の菌糸接着因子として細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) を見出し、AG と GAG の二重欠損株で菌糸が全く塊を形成しないことを発見した。また、候補者は GAG の精製系を確立し、GAG を用いた <i>in vitro</i> 菌糸接着評価系の構築に成功し、GAG を介した菌糸凝集メカニズムを明らかにした。また、AG と GAG の二重欠損株は従来株に比べて高い酵素生産性を示すことを明らかにした。</p> <p>以上、候補者の研究は、糸状菌の二種の菌糸凝集因子の詳細な解析を通して、菌糸凝集メカニズムの提案に至った。これらは学術的にも、産業的にも有用な成果と考えられ、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。</p>	